

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
29 de Marzo de 2001 (29.03.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 01/21185 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 35/78,
A61P 17/06, 7/02

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES00/00354

(22) Fecha de presentación internacional:
21 de Septiembre de 2000 (21.09.2000)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 9902364
23 de Septiembre de 1999 (23.09.1999) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
ASAC COMPAÑIA DE BIOTECNOLOGIA E INVE-
STIGACION, S.A. [ES/ES]; Sagitario, 14, E-03006 Ali-
cante (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): QUIN-
TANILLA ALMAGRO, Eliseo [ES/ES]; Sagitario,
14, E-03006 Alicante (ES). RAMIREZ BOSCA, Ana
[ES/ES]; Sagitario, 14, E-03006 Alicante (ES). BERND,

August [DE/ES]; Sagitario, 14, E-03006 Alicante (ES).
PARDO ZAPATA, José [ES/ES]; Sagitario, 14, E-03006
Alicante (ES). DIAZ ALPERI, Joaquin [ES/ES]; Sagi-
tario, 14, E-03006 Alicante (ES). PAMIES MIRA, David
[ES/ES]; Sagitario, 14, E-03006 Alicante (ES). CAR-
RION GUTIERREZ, Miguel Angel [ES/ES]; Sagitario,
14, E-03006 Alicante (ES). SEMPERE ORTELLS, Jose
Miguel [ES/ES]; Sagitario, 14, E-03006 Alicante (ES).

(74) Mandatario: TOLEDO ALARCON, Eva; Bazán, 20, 6°,
Ofic. 606, E-03001 Alicante (ES).

(81) Estados designados (nacional): AU, CA, JP, US.

(84) Estados designados (regional): patente europea (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

Publicada:

- Con informe de búsqueda internacional.
- Antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones.

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: NOVEL PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF CURCUMA LONGA EXTRACTS

(54) Título: NUEVAS ACTIVIDADES FARMACOLOGICAS DE LOS EXTRACTOS DE CURCUMA LONGA

(57) Abstract: The invention relates to novel pharmacological activities of Curcuma longa extracts as antiproliferative and photo-
sensitizing agent and to their use in the treatment of proliferative pathologies such as psoriasis and in the reduction of plasmatic
fibrinogen and the apolipoprotein B/apolipoprotein A-I quotient without altering other coagulation parameters.

(57) Resumen: Nuevas actividades farmacológicas de los extractos de Curcuma Longa como agente antiproliferativo y fotosensi-
bilizante y su uso en las patologías proliferativas como la psoriasis, así como reductora del Fibrinógeno plasmático y del cociente
Apolipoproteína B/apolipoproteína A-I, sin alterar los demás parámetros de la coagulación.

WO 01/21185 A1

5 TÍTULO DE LA INVENCIÓN

Nuevas actividades farmacológicas de los extractos de *Curcuma longa*.

CAMPO TECNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención la describe las nuevas actividades farmacológicas de los extractos de *Curcuma longa* como agente antiproliferativo con una actividad similar a la betametasona -17-valerato y una actividad fotosensibilizante superior a los psoralenos y su uso en una composición farmacéutica como agente en patologías proliferativas como psoriasis, micosis fungoide, dermatitis atópica, fotodermatosis sin tener los efectos secundarios de los psoralenos, corticoides y/o retinoides, siendo la actividad fotosensibilizante tanto con luz ultravioleta como con luz visible.

15 La presente invención desarrolla una nueva actividad farmacológica de los extractos de *Curcuma* como agente antiateromatoso, reduciendo el fibrinógeno plasmático y reduciendo el cociente apolipoproteína B/apolipoproteína A-I, sin alterar los demás parámetros de la coagulación.

ESTADO DE LA TECNICA

20 La psoriasis es una dermatitis crónica inflamatoria de etiología desconocida. Clínicamente se caracteriza por unas lesiones papulosas, sobre máculas eritemato-escamosas. La mayoría de estas lesiones se desencadenan por alteraciones de la proliferación celular, estas vienen marcadas por mecanismos inmunológicos y genéticos.

Encontramos un incremento del ácido araquínónico y sus derivados, tanto en piel normal como en piel patológica; un incremento de poliaminas, un aumento de leucotrieno B4 en la escama. A partir de la epidermis y dermis encontramos un aumento de células de Langerhans con una disminución del infiltrado de linfocitos CD8 frente a CD4. Los neutrófilos de éstos pacientes sintetizan el doble leucotrienos B4 que los individuos sanos.

La interleucina IL-6 es una citocina estructuradora del factor-2(BSF-2) estructuralmente idéntica al interferón β -2 (IFN- β -2). La IL-6 se sintetiza en los fibroblastos, monocitos y células T. Esta citocina estimula la fase aguda la síntesis de proteínas y la producción de inmunoglobulinas.

- 5 La IL-8 es una interleucina directamente implicada en la psoriasis ya que es la responsable de producir la migración de los neutrófilos que se producen en la epidermis y consecuentemente amplifica el proceso inflamatorio.
- En la terapia actual que se utiliza en la psoriasis es fundamental actuar sobre la proliferación celular y sobre la producción de citocinas mediante el uso de glucocorticoides y/o agentes
- 10 fotosensibilizantes (psoralenos).
- Los cultivos celulares son modelos reconocidos para el estudio de la fisiología celular y el efecto de las drogas. Las células HaCat derivan de queratinocitos humanos que exhiben las mismas diferenciaciones que los queratinocitos normales en cultivo, por consiguiente las células HaCat son un modelo extraordinario para poder testar distintas sustancias de
- 15 aplicación tópica.
- Los queratinocitos son células biológicamente muy activas cuya función no es solamente producción de síntesis de queratinas para formar el estrato córneo sino también tienen capacidad inmunológica basada en la producción y secreción de citoquinas y la expresión selectiva de receptores en su superficie.
- 20 Diversos estímulos incluidas las radiaciones ultravioletas inducen respuestas inflamatorias que actúan directamente sobre estos queratinocitos produciendo una liberación de citoquinas y de moléculas de adhesión. Esta producción de sustancias a nivel de la epidermis inician los cuadros de inflamación cutánea, liberándose la IL-6 y la IL-8 que son dos citocinas implicadas en los procesos inflamatorios cutáneos.
- 25 Los glucocorticoides representan a unas sustancias más utilizadas dentro del campo de la Dermatología debido a sus propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias, efecto que se pone de manifiesto tras la irradiación con UV, no teniendo actividad con la luz visible.
- Diversos estudios demuestran que los corticoides tienen efecto sobre la producción de citoquinas proinflamatorias. Así glucocorticoides conocidos tales como hidrocortisona-17-
- 30 butirato, betametasona-17-valerato producen una disminución de las citoquinas inflamatorias tras la irradiación de luz ultravioleta.
- La accesibilidad de la piel permite a menudo el tratamiento de sus alteraciones mediante la aplicación tópica de medicamentos. Los corticoides tópicos, gracias a su actividad antiinflamatoria, vaso constrictora y antimicótica ha mostrado ser útiles en una gran variedad
- 35 de dermatosis. Sin embargo la aplicación de los corticoides presenta una serie de efectos secundarios directamente sobre la piel:

- 5 - Atrofias cutáneas, lo cual se traduce en una piel fina, transparente, lesiones purpúricas, cicatrices pseudoestelares y estrías por catabolismo de tipo elástico.
- Retraso en la cicatrización de las heridas por inhibición de la función de los fibroblastos.
- Enmascaramiento y destipificación de las infecciones cutáneas especialmente de
- 10 dermatofitosis, llegando a dificultar el diagnóstico y pudiendo aparecer infecciones cutáneas víricas o bacterianas.
- Trastornos de la pigmentación de la piel con hiper o hipopigmentación.
- Dermatitis de contacto.
- Fenómenos de habituación y taquifiloxia que obliga a usar derivados cada vez más
- 15 potentes y el rebote con empeoramiento y aparición de formas más severas del proceso (psoriasis pustulosa) que la supresión brusca de su administración puede provocar.
- Los efectos adversos sistémicos son afortunadamente menos frecuentes ya que se requiere el uso de corticoides durante un tiempo prolongado, como es el caso de la psoriasis. Los efectos secundarios más observados son:
- 20 - Inhibición del eje hipotálamo – hipofisario – suprarrenal.
- La provocación de episodios de hiperglucemia y glucemia.
- Descenso del numero de eosinófilos.
- La presentación de manifestaciones clínicas del Síndrome de Cushing.
- Otras terapias utilizadas en la psoriasis son el uso por vía oral o tópica de sustancias
- 25 fotosensibilizantes (psoralenos) acompañadas de radiaciones ultravioletas A. La fotoquímica de los psoralenos no es bien conocida pudiendo actuar a varios niveles. Los psoralenos se unen al DNA y RNA, pero interaccionan con los lisosomas, endotelios, membranas citoplasmáticas y células dérmicas. En la oscuridad el psoraleno se intercala entre las bases del DNA. Con la UVA se producen monoadductos de ciclobutano al unirse con una base de
- 30 timina o citosina del DNA. Si continúa la radiación, un nuevo fotón estimula al otro doble enlace del psoraleno para formar un enlace cruzado con la timina de la otra cadena de DNA. La formación de estos adductos bifuncionales suprime la síntesis de DNA. Otra reacción observada es que el psoraleno fotoactivado puede actuar con el oxígeno molecular dando un singlete de
- 35 oxígeno, anión superóxido y radicales libres actuando estas formas reactivas sobre los queratinocitos. Así el uso de psoralenos presenta efectos secundarios bien conocidos en la literatura dermatológica tales como disminución de la inmunidad retardada, reacciones

- 5 fototóxicas, inmunosupresión, disminución de la producción de la IL-1 por los queratinocitos y mayor propensión a los cánceres cutáneos.

Por otra parte el uso de sustancias fotosensibilizantes se pueden utilizar en el tratamiento de diferentes patologías con un exceso de hiperproliferación tales como vitílico, dermatitis atópica, granuloma anular, liquen, micosis fungoide, linfomas, leucemia, etc.

- 10 Uno de los mayores factores de riesgo coronario es la concentración plasmática de fibrinógeno. Stone y Thorp *J. Royal College Gen Practitioners* 35,565-569 (1985), demostraron que en hombres entre 40-60 años existía una correlación entre los ataques cardíacos y los niveles plasmáticos de fibrinógeno. Especialmente, en hombres con elevado colesterol y alta presión arterial la frecuencia de ataques cardíacos fueron 6 veces y 12 veces mayores,
- 15 respectivamente, en individuos con altos niveles de fibrinógeno que los individuos con bajos niveles de fibrinógeno. Así en los modelos multivariantes la concentración de fibrinógeno es al menos tan importante como otros factores de riesgo en las patologías cardíacas tales como colesterol, tabaquismo, presión arterial. Otra demostración del papel patogenético del fibrinógeno y sus productos ha sido descrito por Kaplan y Bini. *Arteriosclerosis* 9, 109 (1989).
- 20 Ellos concluyen con la implicación del fibrinógeno en las placas de ateroma. Así, el estudio de placas de ateroma por fluorescencia de anticuerpos (con anticuerpos policlonales antifibrinógeno) muestra el fibrinógeno o fibrina en un amplio rango de lesiones ateroscleróticas.

- De la misma manera, Sadoshima y Tanaka. *Atherosclerosis* 34, 93-97 (1979) han demostrado
- 25 una acumulación de fibrinógeno y LDL en las arterias cerebrales humanas. En las placas tempranas de ateroma se observa fibrinógeno en los intersticios de la íntima y entre las placas internas elásticas de lámina duplicadas. Los autores describen que la acumulación de fibrinógeno en la íntima precede a la LDL y por lo tanto es un mayor factor de riesgo el fibrinógeno que las LDL.

- 30 Por lo tanto, un fármaco capaz de reducir la concentración plasmática de fibrinógeno será útil en el tratamiento y/o profilaxis de las patologías cardiovasculares.

Los fármacos utilizados como reductores del fibrinógeno (ácido salicílico, derivados cumarínicos) actúan aumentando la actividad fibrinolítica teniendo efectos secundarios sobre los parámetros de la coagulación (índice de Quick, tiempo de trombina, tiempo de protombina,

- 35 ATPP).

5 La apolipoproteína B es el componente proteico fundamental de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), de manera que elevadas concentraciones de esta proteína son indicadoras de una cantidad elevada de LDL. Esta lipoproteína es conocido que cuando se oxida, es captada por los macrófagos y su transformación en células espumosas resulta determinante en el inicio de las placas de ateroma. Así cuando mayor apolipoproteína B hay en el plasma el riesgo aterogénico aumenta.

10 La apolipoproteína A-I es un componente fundamental de la partícula de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Su función es activar la enzima lecitín-colesterol-acil-transferasa, encargada de la formación de ésteres de colesterol, a partir del colesterol libre procedente de los tejidos periféricos y de los fosfolípidos que forman la propia partícula de las HDL. Estas lipoproteínas resultan fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol ya que retiran el colesterol acumulado en los tejidos periféricos y lo llevan al hígado donde es eliminado en forma de ácidos biliares o recirculando a otras lipoproteínas. Así elevadas concentraciones de Apo A-I son indicativas de un menor riesgo aterogénico.

20 Por lo tanto la relación Apo B/Apo A-I es mejor indicador del riesgo aterogénico, ya que la direccionalidad de los cambios en los procesos de aterosclerosis usualmente conlleva aumento de Apo B y una disminución de Apo A-I.

La curcumina y los curcuminoides presentes en los rizomas de la *Curcuma longa* y en general en la familia de las Zingiberaceas han sido utilizados para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades, a título de ejemplo se puede citar US 5891924 (inhibidor de la activación del NF kappa B), US 5336496 (inhibidor de la delta 5 desaturasa), EP 256353 (tratamiento de los síndromes de mala absorción), EP 568001 (agente antiviral), US 5108750 (reductor de la hiperlipidemia y agregación plaquetaria), FR 2655054 (protector celular) y EP 550807 (actividad antioxidante y antiinflamatoria), EP440885 (antiinflamatorio), EP 319058 (contra la caída del pelo), US 510750, US 4906471 y US 4842859 (agente antiagregante plaquetario y antiolesterol), WO 88/05304 (tratamiento de los desórdenes neurológicos), W 96/03999 (reductor de los peróxidos lipídicos), ES 20103689 (modulador de las lipoproteínas de alta y baja densidad oxidadas, protector de los queratinocitos frente a los radicales libres y aumentador de la proliferación celular en tejidos humanos envejecidos). La patente china CN1156601 describe el uso de una de una composición medicinal preparada a partir de 13 plantas, incluida la *Curcuma longa*, como agente reductor de los triglicéridos y colesterol aumentando las HDL.

- 5 En la literatura científica el número de documentos recuperados es abundante, describiéndose diferentes actividades farmacológicas tales como agente antitumoral, antiinflamatorio, cicatrizante, inhibidor de la proliferación, antifúngico etc.
- El extracto acuoso de *Curcuma longa*, libre de curcuminoides, ha mostrado también una actividad antioxidante, Srinivas et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **292** nº2 617-623
- 10 (1992), describiendo la actividad antioxidante de la turmerina, proteína presente en los rizomas de *Curcuma*. Yeharayu et al *Ind J. Med. Res.* **64**, 4, 601 (1976), describen la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Curcuma longa* con una actividad similar a la hidroclorona. Gonda et al. *Chem Pharm Bull* **40**, 990 (1992) nos enseña la actividad inmunológica del ukonano A y sus productos de degradación.
- 15 Los documento más cercano a nuestra invención Tonnessen et al *J. Pharm Sci* **76**, nº5 (1987) describe la actividad fototóxica de la curcumina en sistemas biológicos sin núcleo (E. Coli, *Salmonella typhimuis*); sin embargo este documento nos comenta los posibles efectos mutagénicos producidos sobre DNA.
- Dhal y colaboradores *Photochemistry and Photobiology* **59** nº 3, 290 (1994) describen la
- 20 actividad fototóxica de la curcumina en células de ratas.
- Ningún documento del estado de técnica describe la acción fotosensibilizante de los extractos acuosos *Curcuma longa*, inhibición de secreción de las citocinas inflamatorias después de la irradiación con UVA y/o visible de extractos acuosos de *Curcuma longa* y/o los efectos beneficiosos a nivel clínico e histólogo de una composición farmacéutica cuyo principio activo
- 25 es el extracto acuoso de *Curcuma longa* en diferentes tipos de psoriasis por vía oral y tópica.
- El desarrollo de esta nueva actividad farmacológica de los extractos de *Curcuma longa* hace de él un fármaco ideal para el tratamiento de patologías con una hiperproliferación celular como la psoriasis, sin los efectos secundarios que poseen los tratamientos utilizados actualmente (psoralenos, corticoides). Además la actividad fotosensibilizante de los extractos de
- 30 *Curcuma* con luz visible evita los posibles efectos mutagénicos de las radiaciones ultravioletas A ó B.
- Tampoco el estado de la técnica describe la acción reductora del fibrinógeno y del cociente Apolipoproteína B /Apolipoproteína A-I de los extractos *Curcuma longa*. El desarrollo de esta nueva actividad farmacológica de los extractos de *Curcuma longa* hace de él un fármaco ideal
- 35 para el tratamiento de la aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares, sin modificar los parámetros de la coagulación.

5 Los documentos más cercanos a nuestra invención describen la actividad reductora de los peróxidos lipídicos, reductora del colesterol que son factores etiopatogénicos del proceso aterosclerótico, sin embargo no existe una relación directa entre estos factores.

De esta manera, la vitamina C y la vitamina E drogas que poseen una actividad antioxidante y reductora de los peróxidos lipídicos no han causado efecto en la concentración plasmática del
10 fibrinógeno en humanos tras su administración. (Bates et al *J Hypertens.* Jul; **16** (7): 925-32 (1998)). Moghadasian et al *Circulation* Abr 6; 99 (13): 1733-1739 (1999) concluyen que el probucol que posee una conocida capacidad hipolipolipimiente y antioxidante aumenta las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno, mostrando una actividad proaterogénica. Rifici et al *Thromb Haemost* Sep; **78** (3): 1111-4 (1997) demuestran que la lipooxidación producida por
15 vitaminas antioxidantes no altera la actividad fibrinolítica.

El uso de extractos vegetales de plantas con actividad farmacológica es conocido, de la misma forma los principios activos pueden ser aislados y purificados a partir de los extractos de las plantas. Sin embargo los principios activos purificados y/o obtenidos sintéticamente podrían tener efectos secundarios o ser tóxicos, por ejemplo atropina, digital, nicotina etc.

20 Los extractos vegetales contienen una serie de especies químicas relacionadas estructuralmente debido a los procesos metabólicos en las plantas. Estos compuestos relacionados pueden ejercer un efecto sinérgico en la actividad farmacológica. Éstas sustancias químicas se utilizan como marcadores, con el fin de estandarizar los extractos cualitativamente y cuantitativamente. Los extractos alcohólicos de Curcuma se caracterizan
25 químicamente por la presencia de curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina y bisdesmetxosicurcumina), el extracto acuoso de Curcuma se caracteriza por la ausencia de curcuminoides, por la presencia de una fracción proteica y por una fracción polisacárida, en los que se han identificado el ukonano A, B y C. La acción farmacológica es debida al conjunto del extracto de *Curcuma longa.*, extracto acuoso y/o alcohólico.

30

OBJETIVO DE LA INVENCION

La presente invención desarrolla una nueva aplicación terapéutica del extracto acuoso de *Curcuma longa* como agente fotosensibilizante, como agente antiproliferativo y su uso en
35 patologías con un exceso de proliferación celular, tanto con luz ultravioleta como con luz visible.

- 5 La presente invención desarrolla una nueva aplicación terapéutica de los extractos de *Curcuma longa* como reductor de los niveles plasmáticos de fibrinógeno reduciéndolos a los valores normales en sujetos sanos y reductor del cociente apolipoproteína B /apolipoproteína A.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

- 10 El extracto alcohólico de *Curcuma longa* es obtenible según la patente española ES 2103689 mediante la extracción de los rizomas de *Curcuma* por maceración con un alcohol (metanol, etanol) a 50° C durante 24 horas y posterior eliminación del disolvente a presión reducida. El extracto alcohólico de *Curcuma longa* se caracteriza químicamente por la presencia de curcuminoides. Alternativamente se pueden utilizar otros métodos de extracción y/ o
- 15 purificación conocidos para un experto en la materia tales como extracción con otros disolventes orgánicos, extracción con disolventes en estado supercrítico, extracción a reflujo, extracción por corriente a vapor y pudiéndose efectuar distintas purificaciones del extracto por cristalización fraccionada, cromatografía, extracción líquido-líquido etc.
- De la misma forma el extracto acuoso de *Curcuma* es obtenible por maceración con agua
- 20 durante 24 horas a 50 – 70 ° C con posterior eliminación del disolvente a presión reducida. El extracto acuoso de *Curcuma longa* se caracteriza químicamente por la presencia de una fracción proteica con una concentración alrededor del 20-30 %, determinado por el método Pierce, analizando el nitrógeno proteico, y un contenido en polisacáridos (ukonano A, B y C)entre el 3 –8 % y la ausencia de curcuminoides, no siendo objeto de la invención el
- 25 procedimiento de fabricación de los extractos de *Curcuma longa*.
- Alternativamente se pueden efectuar combinaciones con los dos extractos obteniéndose extractos hidroalcohólicos caracterizándose químicamente los extractos por su concentración en los marcadores (concentración en curcuminoides y concentración en proteínas y en concentración polisacáridos),
- 30 El contenido de los marcadores se puede realizar por los métodos descritos en el estado de la técnica. Los curcuminoides se pueden cuantificar mediante espectrofotometría de visible-ultravioleta a 420 nm, la fracción proteica se puede cuantificar mediante el método Pierce analizando el nitrógeno proteico y/o mediante cromatografía de líquidos, la fracción polisacárica se cuantifica mediante cromatografía de líquidos.
- 35 El extracto hidroalcohólico *Curcuma longa* ha mostrado una actividad farmacológica superior a la curcumina (mayor actividad proliferativa, mayor actividad fotosensibilizante, mayor

5 inhibición de la secreción de citocinas), apoyando estos resultados que los extractos vegetales son fármacos diferentes a los moléculas responsables de la acción farmacológica por que existe una farmacodinamia diferente (absorción, distribución, acción y eliminación) pudiéndose producir efectos sinérgicos o antisinérgicos entre los diferentes especies químicas presentes en el extracto. El extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* ha mostrado una actividad
 10 antiproliferativa similar a la betametasona – 17- valerato. Este extracto hidroalcohólico mostró una disminución significativa en la incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) en el DNA de cultivos de queratinocitos humanos entre concentraciones entre 5 µg/ml y 50 µg/ml de extracto, siendo este efecto similar a la betametasona – 17- valerato.

Tanto el extracto acuoso de *Curcuma* como el extracto de hidroalcohólico de *Curcuma longa*
 15 han inhibido la secreción de citocina IL-6 y/o IL-8 en cultivos de queratinocitos humanos con una actividad similar a la betametasona – 17- valerato, aumentándose esta inhibición tras irradiar la células como luz ultravioleta A.

Los extractos hidroalcohólicos y acuosos de *Curcuma* han mostrado una inhibición de la proliferación celular sin alterar actividad mitocondrial, no teniendo los extractos efectos sobre la
 20 síntesis de proteínas, por lo tanto el extracto posee una actividad citoestática.

Por otra parte los extractos hidroalcohólico poseen una actividad fotosensibilizante y por lo tanto pueden ser utilizados en las patologías proliferativas como psoriasis, vitiligo, linfomas, micosis fungoide, etc. como sustituto de los psoralenos.

Los extracto de *Curcuma longa* en estudios realizados con sobre células eucariotas
 25 (queratinocitos humanos), se ha encontrado en el citoplasma la curcumina activada por consiguiente el núcleo está libre de curcumina y el extracto no interacciones con el DNA nuclear no apareciendo los efectos secundarios y mutagénicos producidos por los psoralenos.

El extracto hidroalcohólico (10% de curcuminoides, 18% de fracción proteica, 3% en polisacáridos) de *Curcuma* muestra una mayor actividad fotosensibilizante tras la irradiación
 30 con UVA que la curcumina.

Así, para una mayor actividad fotosensibilizante (menor porcentaje de incorporación de BrdU) es menor una menor cantidad de droga

% incorporación	80	60	40	20
Ng extracto	2000	4000	5000	6000
Ng curcumina equiv	200	400	500	600

Ng curcumina	600	800	1000	1200
--------------	-----	-----	------	------

5

Para producir el mismo grado de fotosensibilización que los extractos de Curcuma es necesario emplear dosis de 10 ng/ml de psoraleno produciendo a estas dosis efectos tóxicos y mutagénicos

La administración de una crema cuyo principio activo es el extracto acuoso de *Curcuma longa* al 2%- y un comprimido al día con 100 mg de extracto acuoso con los excipientes farmacéuticamente aceptables se ha mostrado eficaz clínicamente en los diferentes tipos de psoriasis, potenciándose los efectos tras la irradiación con luz ultravioleta A, no mostrándose efectos secundarios como sucede con el uso de corticoides.

Se estudiaron 22 pacientes afectados de diferentes tipos de psoriasis: Guttata, Vulgar, Invertida, Palmo-plantar, Postulosa. Durante 15 días estuvieron sin ningún tratamiento antipsoriático (retinoides, corticoides, etc.), posteriormente se les aplicó solamente la crema con extracto acuoso de Curcuma y se les administró un comprimido cada 12 días. La crema fue perfectamente tolerada por todos pacientes y ningún paciente tuvo que suspender el tratamiento por presentar reacciones adversas cutáneo o sistémico.

Todos los pacientes y todos los tipos de psoriasis respondieron a esta terapia. En la psoriasis palmo-plantar que es rebelde a los tratamientos convencionales todos los pacientes respondieron al tratamiento. En la psoriasis vulgar se redujo la placa tras la administración. En la psoriasis pustulosas fisuradas y/o ulceradas cicatrizaron rápidamente. En la psoriasis invertida se vio un efecto antiséptico y secante.

La asociación del extracto acuoso de Curcuma con UVA favoreció la acción del producto, blanqueando las lesiones a los tres días de tratamiento.

El extracto hidroalcohólico (10% de curcuminoides, 18% de fracción proteica, 3% en polisacáridos) de Curcuma ha mostrado una actividad fotosensibilizante con la luz visible, inhibiendo el porcentaje de incorporación de BrdU en el DNA tras la irradiación con luz visible en cultivos de queratinocitos humanos.

La administración de una crema cuyo principio activo es el extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* al 2%- y excipientes farmacéuticamente aceptables se ha mostrado eficaz clínicamente en los diferentes tipos de psoriasis, que no respondían a los tratamientos con corticoides y ni con PUVA, desapareciendo tras 15 días de tratamiento el eritema, la infiltración y la descamación con el tratamiento de la crema con extracto hidroalcohólico de

- 5 *Curcuma Longa* potenciándose los efectos tras la irradiación con luz visible; no mostrándose efectos secundarios como sucede con el uso de psolarenos y la luz ultravioleta.

Los extractos de *Curcuma longa* (50 mg de extracto alcohólico y 50 mg de extracto polar de *Curcuma longa*), equivalentes a 10 mg de curcuminoides y 15 mg de proteínas y 2 mg de polisacáridos) junto excipientes farmacéuticamente aceptables administrados durante 30 días,

- 10 2 comprimidos al día a 30 individuos sanos (16 hombres-14 mujeres) con edades comprendidas entre 24 y 75 años mostró una reducción significativa en los niveles de fibrinógeno, estando los valores al final de tratamiento entre 240-290 mg/dl. Tras la administración de los extractos de *Curcuma* los niveles de fibrinógeno plasmático se normalizaron hasta los valores estándar, es decir los extractos de *Curcuma* no poseen una
- 15 actividad fibrinolítica, reduciendo solamente los niveles de fibrinógeno en los individuos con altos niveles de fibrinógeno.

Así valores de 809, 690, 584, 490 mg/dl de fibrinógeno pasaron a valores de 241,240, 290,272 mg/dl tras el tratamiento.

- Los parámetros de la coagulación tales como Índice de Quick, tiempo de trombina, ATPP,
- 20 tiempo de protombina, no sufrieron cambios significativos, estando los valores al final del tratamiento dentro de los valores de referencia.

No se observaron efectos secundarios tales como hemorragias, náuseas, vómitos, etc. No mostrando toxicidad alguna los comprimidos.

- A continuación la invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, no
- 25 siendo limitativos del alcance de la misma.

BREVE EXPLICACIÓN DE LAS FIGURAS

- 30 Figura 1- Inhibición de la secreción de IL-6 y IL-8 tras la irradiación con luz ultravioleta del extracto acuoso de *Curcuma* (ZCL3) y betametasona -17-valerato (B-17-V)

Figura 2- Inhibición de la secreción de IL-6 y IL-8 tras la irradiación con luz ultravioleta del extracto hidroalcohólico de *Curcuma* (ZCL4) y betametasona -17-valerato (B-17-V).

- Figura 3- Incorporación de BrdU del extracto hidroalcohólico de *Curcuma* (ZCL4) y
- 35 betametasona -17-valerato (B-17-V).

5 Figura 4- Efecto del extracto acuoso de Curcuma (ZCL3) sobre la incorporación de BrdU en el DNA tras la irradiación UV. Capacidad fotosensible.

Figura 5- Efecto del extracto hidroalcohólico de Curcuma (ZCL4) sobre la incorporación de BrdU en el DNA tras la irradiación UV. Capacidad fotosensible.

Figura 6- Efecto de la curcumina sobre la incorporación de BrdU en el DNA tras la irradiación UV. Capacidad fotosensible.

Figura 7- Efecto del psoraleno sobre la incorporación de BrdU en el DNA tras la irradiación UV. Capacidad fotosensible.

Figura 8. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* sobre la incorporación de BrdU en el DNA de queratinocitos humanos con irradiación de luz visible (450 nm) y sin radiación, representado en abscisas la concentración en $\mu\text{g/ml}$ de extracto y en ordenadas el porcentaje de incorporación de BrdU. Capacidad fotosensibilizante con luz visible.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Variación del fibrinógeno plasmático y parámetros de coagulación tras la ingesta de Curcuma.

Sobre un total de 30 individuos sanos (16 hombres y 14 mujeres) con edades comprendidas entre 24 y 75 años con buen estado de salud se estudió el efecto de los extractos de Curcuma sobre el fibrinógeno y los parámetros de coagulación.

A tiempo cero se extrajo sangre de la vena cubital y se determinó el fibrinógeno plasmático por el método de Clauss por coagulación. (Clauss A. *Acta haemat* 1957;17: 237) y los parámetros de coagulación.

Durante 15 días se administraron 2 comprimidos diarios y a los 30 días de empezar el tratamiento se volvió a determinar el fibrinógeno plasmático y los parámetros de coagulación.

-Composición por comprimido:

Extracto hidroalcohólico de <i>Curcuma</i>	100.0 mg *
Celulosa microcristalina	490.8 mg
Almidón de maíz	45,0 mg
Aerosil	1.5 mg
Primojel	22.5 mg
Encompress	15.0 mg

5 Estearato magnésico

10.1 mg

*Equivalente a no menos de 10 mg de curcuminoides y 15 mg de fracción proteica y 2 mg de polisacáridos.

10 Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

SEXO	FIBRINÓGENO T=0	FIBRINÓGENO T=30
V	228	215
M	263	267
V	237	215
M	245	272
M	173	250
V	256	216
V	354	335
M	220	243
V	216	210
V	205	221
V	226	371
V	189	168
M	251	282
M	216	216
M	251	302
V	191	191
V	476	272
M	302	218
M	243	187
V	207	201
V	232	305
V	296	296
V	809	241
M	237	409
V	254	267

M	480	268
M	690	240
V	584	290
M	490	272
M	490	272

5

Valores de referencia fibrinógeno: 150 – 450 mg/dl.

El extracto de Curcuma normaliza los valores patológicos de fibrinógeno a los valores de referencia.

Variación de los parámetros de coagulación tras la ingesta de *Curcuma longa*

T. Protombina		I.Quick		APTT		T. Trombina	
T=0	T=30	T=0	T=30	T=0	T=30	T=0	T=30
13.3	13.3	85.9	85.9	29.3	30.6	16.6	17.0
12.3	13.5	95.7	84.2	30.9	28.1	15.9	11.0
13.2	13.4	86.8	85.1	29.3	31.2	17.3	15.9
14.2	14.1	78.7	74.0	37.9	34.4	16.6	16.8
13.8	13.6	81.7	83.4	30.7	26.5	16.6	12.0
13.1	14.2	87.7	78.7	31.2	33.5	16.4	16.2
13.2	12.8	86.8	90.6	30.8	31.3	17.0	16.2
13.3	12.8	85.9	90.6	30.1	31.4	15.9	15.9
13.5	14.1	84.2	79.4	30.4	30.3	16.9	16.3
14.8	13.8	74.5	81.7	30.6	32.3	16.3	16.0
12.9	13.7	86.6	82.5	33.9	30.0	15.9	15.8
14.6	13.9	75.8	80.9	34.7	31.8	17.2	16.3
13.5	12.3	84.2	95.7	36.8	30.2	17.1	16.4
13.7	13.7	82.5	82.5	29.5	29.5	16.7	16.7
13.0	13.5	88.7	84.2	31.2	29.8	17.3	16.7
14.4	14.4	77.2	77.2	33.3	33.3	17.1	17.1
12.0	14.9	99.1	73.8	31.3	29.3	15.9	15.5
14.0	13.9	80.2	80.9	29.9	33.2	16.8	15.2
12.9	14.3	89.6	77.9	30.3	32.3	15.9	16.3

14.3	13.9	77.9	80.9	35.2	32.8	17.3	17.3
13.8	12.2	81.7	96.9	30.6	28.9	16.2	16.7
12.6	12.6	92.6	92.6	33.0	33.0	15.9	15.9
13.7	13.5	82.5	84.2	29.1	29.1	16.1	17.0
13.1	11.6	87.7	100	30.2	30.5	16.2	14.0
13.0	12.4	88.7	94.7	28.7	28.9	16.2	16.2
14.8	13.8	89.6	90.9	32.9	29.9	16.1	15.9
15.2	14.0	83.2	89.8	31.6	30.1	17.2	14.9
13.9	13.9	86.8	100	34.2	32.4	15.4	16.0
14.6	12.8	70.9	88.8	30.8	28.8	15.9	16.3
13.8	14.1	84.8	90.4	33.7	30.0	16.1	14.8

5

Valores de referencia

Tiempo de protrombina: 10 – 20 segundos

Tiempo de trombina: 10 – 20 segundos

Indice Quick: 75 – 100

10 APTT: 28–40 segundos.

Todos valores después del tratamiento estaban dentro de los valores de referencia.

Ejemplo 2 .Variación del cociente apolipoproteína B/ apolipoproteína A tras la ingesta de comprimidos de Curcuma.

15 Sobre un total de 13 individuos sanos con edades comprendidas entre 24 y 75 años con buen estado de salud se estudió el efecto de los extractos de Curcuma sobre las apolipoproteínas A-I y B.

A tiempo cero se extrajo sangre de la vena cubital y se determinaron las apoproteínas A-I y B nefelométricamente y posteriormente se calculó su cociente. Tras 15 días de tratamiento, según el ejemplo 1 se reanalizaron las apolipoproteínas A-I y B.

20

Apo B		Apo A		ApoB/ApoA	
T=0	T=30	T=0	T=30	T=0	T=30
100	120	104	100	1.04	0.83
120	160	141	110	1.17	0.68
157	172	136	126	0.86	0.73

130	141	96	90	0.73	0.63
146	160	65	60	0.44	0.38
155	166	70	53	0.46	0.32
90	138	101	82	1.10	0.59
125	164	99	74	0.79	0.45
110	151	86	76	0.78	0.50
160	179	109	88	0.68	0.49
99	133	102	90	1.03	0.67
104	141	116	103	1.10	0.73

5

Tras la ingesta del extracto de *Curcuma longa* se observa una tendencia significativa a la baja del cociente ApoB/ApoA.

Ejemplo 3 Efecto del extracto acuoso de Curcuma en la psoriasis

Composición cuantitativa de la crema:

10	Extracto acuoso de Curcuma *	2 %
	Fase grasa	27 %
	Emulgentes	47 %
	Humectantes	20 %
	Conservantes	1%
15	Reguladores pH	1%
	Agua	cps

*Contenido en proteínas no menor al 15%., contenido en polisacáridos no menor al 4%.

Se estudiaron 22 pacientes diagnosticados de psoriasis distribuidos por edades y sexo.

20

Sexo	Edad	Tipo psoriasis
M	12	Guttata
M	22	Vulgar
M	37	Palmo-plantar
V	24	Vulgar
V	48	Vulgar
M	51	Invertida

M	27	Palmo-plantar
V	19	Vulgar
V	57	Palmo-plantar
V	61	Invertida
M	46	Palmo-plantar
V	6	Pustolosa Loc
V	16	Vulgar
M	32	Vulgar
M	39	Pustulosa loc
M	41	Vulgar
V	31	Palmo-plantar
M	13	Guttata
M	3	Vulgar
M	51	Vulgar
M	60	Invertida
M	19	Palmo plantar

5

Criterios de inclusión:

- Pacientes diagnosticados de psoriasis clínicamente e histológicamente.
- No presentaban otra patología concomitante.
- No recibieron tratamiento antipsoriático.

10 Protocolo:

A los 22 pacientes se les mantuvo durante 15 días sin ningún tipo de tratamiento, emolientes, corticoides, retinoides, ácidos grasos.

Se les indicó a los pacientes que se aplicaran la formulación 3 veces al día con un ligero masaje y 1 comprimido cada 12 horas.

15 Resultados:

Todos los pacientes mostraron una buena tolerancia. La crema no presentó ningún tipo de reacción irritativa o de contacto.

Los casos que mostraban psoriasis guttata evolucionaron de la misma forma. Las lesiones que presentaban eran poco escamosas pero muy eritematosas. A los 7 días de tratamiento no

- 5 había ya escamas y el eritema presentado era mínimo. A los 14 días tratamiento las lesiones no se percibían. No se presentaron lesiones pigmentarias residuales.
- De las 6 psoriasis palmo-plantares, 4 de ellas presentaban una afectación más evidente de las palmas, con lesiones escamosas y con una fisuración importante. A los 7 días de tratamiento la fisuración dolorosa y penosa para los pacientes había desaparecido, sólo se percibió una
- 10 lesión eritematosa de bordes mal definidos sin prácticamente nada de escamas. A los 14 días las lesiones se limitaban a una mácula ligeramente eritematosas con una piel de características normales. Las lesiones plantares presentaban hiperqueratosis importante con fisuración, fueron más rebeldes y se obtuvieron resultados a los 14 días de tratamiento, observándose una cicatrización de las fisuras.
- 15 Los dos pacientes que presentaban psoriasis pustulosa cicatrizaron las lesiones a la semana de tratamiento y la desaparición de la descamación se produjo a los 14 días de tratamiento.
- En los pacientes afectados de psoriasis invertida las lesiones presentaban una ligera descamación e intensamente eritematosas con la superficie erosionada. Se practicaron cultivos y las placas estaban contaminadas por *Candidas*. A los 7 días de tratamiento la
- 20 descamación había desaparecido y el eritema disminuido. A los 14 días de tratamiento sólo se observó una mácula ligeramente eritematosa.
- La psoriasis vulgar fue la mas estudiada debido a tener un número mayor de pacientes. Las lesiones localizadas en tronco presentaban una infiltración importante y descamación periférica. En las articulaciones predominaba la hiperqueratosis. A los 7 días de tratamiento
- 25 disminuyó drásticamente la infiltración y el eritema. A los 14 días de tratamiento la evolución fue positiva tanto en tronco como en articulaciones de modo que solo se percibían lesiones mínimamente eritematosas en el tronco y algo descamativas en codos y rodillas.
- Los pacientes tratados con PUVA con psoriasis palmo plantar a las 72 horas de tratamiento desaparecieron las fisuras y las descamaciones. Los pacientes tratados con PUVA con
- 30 psoriasis vulgar después de 2 sesiones las lesiones se mostraron sin infiltración y descamación.

Ejemplo 4. Efectos del extracto de *Curcuma longa* sobre la secreción de las interleucinas IL-6 y IL-8 en cultivos de queratinocitos humanos.

- 35 Cultivo de la línea HaCat:

- 5 La línea HaCat es una línea inmortalizada de queratinocitos humanos normales. Estas células cultivan en un medio de cultivo compuesto por líquido de Hanks al cual se le adiciona un 5% de suero bovino fetal y un 2% de penicilina-estreptomicina a 37° C en atmósfera de CO₂.

Determinación de las interleucinas

- Después de 48 horas de incubación con o sin radiación, se toma el sobrenadante de los
10 cultivos para medir la IL-6 IL-8 utilizando un test –kit ELISA. El mínimo de detección de para cada ensayo es de 3.13 pg/ml para la IL-6 y 31.0 pg/ml para la IL-8.

Irradiación de las células.

- Las células fueron irradiadas mediante una lampara de emisión de UVA/UVB cuyo rango es de UVA 340-390 nm; UVB 290-310, no emitiendo UVC. Las dosis de irradiación fueron de 150
15 mJ/cm² . Para evitar la formación de productos tóxicos procedentes del medio de cultivo se cambió por PBS libre iones calcio y magnesio antes de la irradiación .

Resultados:

- El extracto hidroalcohólico y acuoso de Curcuma a dosis de 50 µg/ml inhibieron la secreción de las interleucina IL-6 y IL-8 tras la irradiación con luz UVB de forma similar que la
20 betametasona –17-valerato. Figura 1, 2

Ejemplo 5. Efecto de los extractos de *Curcuma longa* sobre la incorporación de BrdU en el DNA de queratinocitos humanos.

Cultivo de la línea HaCat:

- La línea HaCat es una línea inmortalizada de queratinocitos humanos normales. Estas células
25 cultivan en un medio de cultivo compuesto por líquido de Hanks al cual se le adiciona un 5% de suero bovino fetal y un 2% de penicilina-estreptomicina a 37° C en atmósfera de CO₂.

Incorporación de BrdU :

- Para determinar la tasa de replicación, las células fueron cultivadas en microplacas a una densidad de 2*10⁴ células por pocillo. Después de 24 horas de tratamiento el medio fue
30 renovado y los cultivos fueron incubados durante 24 horas a 37°C con diferentes concentraciones de los extractos y betametasona –17 – valerato con una concentración de 10 µg/ml. Se realizaron controles con el disolvente (etanol 0.1%) en paralelo. La incorporación de BrdU se determinó con test de ELISA.

Resultados:

- 35 La incubación de las células con 50 µg/ml de extracto hidroalcohólico conduce a una disminución significativa en la incorporación con BrdU. El extracto hidroalcohólico, combinación

- 5 del extracto alcohólico y acuoso de *Curcuma longa*, demostró una actividad antiproliferativa similar a la betametasona – 17- valerato. Figura 3

Ejemplo 6 . Efecto de los extractos de *Curcuma longa* sobre la incorporación de BrdU en el DNA de queratinocitos humanos tras la irradiación con luz ultravioleta.

Cultivo de la línea HaCat

- 10 La línea HaCat es una línea inmortalizada de queratinocitos humanos normales. Estas células cultivan en un medio de cultivo compuesto por líquido de Hanks al cual se le adiciona un 5% de suero bovino fetal y un 2% de penicilina-estreptomicina a 37° C en atmósfera de CO₂.

Incorporación de BrdU:

- 15 Para determinar la tasa de replicación, las células fueron cultivadas en microplacas a una densidad de 2×10^4 células por pocillo. Después de 24 horas de tratamiento el medio fue renovado y las cultivos fueron incubados durante 24 horas a 37°C con diferentes concentraciones de los extractos, de la curcumina y psoraleno a diferentes concentraciones. Se realizaron controles con el disolvente (etanol 0.1%) en paralelo. La incorporación de BrdU se determinó con test de ELISA.

- 20 Las células se irradiaron con luz UVA con una intensidad 1J/cm² y posteriormente se analizó la incorporación de BrdU.

Resultados :

- 25 El extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* con un 10% de curcuminoides ,un 18 % en proteínas y un 3% en fracción polisacárida mostró una actividad fotosensibilizante mayor que la curcumina tras la irradiación con luz UVA, es decir menor cantidad de producto un porcentaje de incorporación.

El extracto acuoso de *Curcuma longa* posee una actividad fotosensibilizante.

Para producir el mismo grado de fotosensibilización que los extractos de Curcuma es necesario emplear dosis de psoraleno tóxicas (10 ng/ml). Figuras 4, 5,6, 7.

30

Ejemplo 7. Efecto de los extractos hidroalcohólicos de *Curcuma longa* en la psoriasis con radiación visible.

Composición cuantitativa de la composición farmacéutica:

	Extracto hidroalcohólico de Curcuma *	2 %
35	Fase grasa	27 %
	Emulgentes	47 %

5	Humectantes	20 %
	Conservantes	1%
	Reguladores pH	1%
	Agua	cps

* Equivalente a un 10% en curcuminoides, 18 % en proteínas.

10

Se estudiaron 8 pacientes afectados, diagnosticados y tratados de diferentes tipos de psoriasis: Guttata, Vulgar, Invertida y Palmo-plantar. El tratamiento anterior consistió en la aplicación de cremas de corticoides, sesiones de PUVA (alrededor de 14 sesiones por paciente) y en algunos casos terapia con retinoides. Los pacientes tenían las siguiente distribución de sexos, edades y tipos de psoriasis.

	Edad	Sexo	Tipo de psoriasis
	9	Mujer	Psoriasis palmar
	6	Mujer	Psoriasis Guttata
20	31	Varón	Psoriasis vulgar
	46	Mujer	Psoriasis vulgar
	19	Mujer	Psoriasis Palmo-plantar
	56	Mujer	Psoriasis vulgar y Palmo-plantar
	14	Mujer	Psoriasis guata
25	28	Varón	Psoriasis invertida

La crema con el extracto hidroalcohólico de se aplicó sobre las lesiones y tras 10 minutos los pacientes fueron irradiados con una lámpara de 440 nanómetros durante tres minutos. Las sesiones se efectuaron cada semana. A las 48 horas, 5 días y 15 se valoró el eritema, la infiltración y la descamación.

30

Los resultados obtenidos fueron:

		Día 0		
	Tipo de psoriasis	Eritema	Infiltración	Descamación
35	Psoriasis Palmar	++	+++	+++
	Psoriasis Guttata	++	+++	++
	Psoriasis vulgar	++	++	+++

5	Psoriasis Palmo-plantar	+	+++	+++
	Psoriasis invertida	+++	++	+
Día 2				
	Tipo de psoriasis	Eritema	Infiltración	Descamación
10	Psoriasis Palmar	++	++	++
	Psoriasis guata	++	++	+
	Psoriasis vulgar	+	++	+++
	Psoriasis Palmo-plantar	+	+	++
	Psoriasis invertida	++	++	+
15	Día 5			
	Tipo de psoriasis	Eritema	Infiltración	Descamación
	Psoriasis Palmar	++	+	+
	Psoriasis guata	+	+	-
20	Psoriasis vulgar	+	+	+
	Psoriasis Palmo-plantar	+	-	++
	Psoriasis invertida	-	+	-
Día 15				
25	Tipo de psoriasis	Eritema	Infiltración	Descamación
	Psoriasis Palmar	+	-	-
	Psoriasis guata	+	-	-
	Psoriasis vulgar	-	-	+
	Psoriasis Palmo-plantar	-	-	+
30	Psoriasis invertida	-	-	-
	+++ intenso			
	++moderado			
	+leve			
	- negativo			
35	Observándose una mejora tanto en el eritema, infiltración y descamación tras el tratamiento con el extracto de <i>Curcuma longa</i> e irradiación con luz visible.			

5

Ejemplo 8 . Efecto de los extractos de *Curcuma longa* sobre la incorporación de BrdU en el DNA de queratinocitos humanos tras la irradiación con luz visible

Cultivo de la línea HaCat

La línea HaCat es una línea inmortalizada de queratinocitos humanos normales. Estas células
10 cultivan en un medio de cultivo compuesto por líquido de Hanks al cual se le adiciona un 5% de suero bovino fetal y un 2% de penicilina-estreptomicina a 37° C en atmósfera de CO₂.

Incorporación de BrdU:

Para determinar la tasa de replicación, las células fueron cultivadas en microplacas a una densidad de 2*10⁴ células por pocillo. Después de 24 horas de tratamiento el medio fue
15 renovado y las cultivos fueron incubados durante 4 horas a 37°C. con diferentes concentraciones de los extractos. Después de la radiación las células fueron incubadas durante 20 horas a 37° C. Se realizaron controles con el disolvente (etanol 0.1%) en paralelo. La incorporación de BrdU se determinó con test de ELISA.

Las células se irradiaron con luz visible usando una lámpara actinia con un espectro de
20 emisión de 400-550 nm (máximo a 450 nm)

Resultados :

El extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* con un 10% de curcuminoides, un 18 % en proteínas y un 3% en fracción polisacárida mostró una disminución de la síntesis de DNA, alcanzándose el máxima inhibición de la incorporación de BrdU a concentraciones de 10
25 µg/ml de extracto. Figura 8.

5 REIVINDICACIONES

- 1.- Utilización de un extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa*, compuesto por una extracto alcohólico que contiene curcuminoides y un extracto acuoso que contiene una fracción proteica para la fabricación de una composición farmacéutica como agente fotosensibilizante.
- 10 2.- Utilización de un extracto acuoso que contiene una fracción proteica de *Curcuma longa* para la fabricación de una composición farmacéutica como agente fotosensibilizante.
- 3.- Utilización de un extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa*, compuesto por un extracto alcohólico que contiene curcuminoides y un extracto acuoso que contiene una fracción proteica para la fabricación de una composición farmacéutica como agente antiproliferativo.
- 15 4 Utilización de un extracto acuoso de *Curcuma longa* que contiene una fracción proteica para la fabricación de una composición farmacéutica como agente antiproliferativo.
- 20 5.- Utilización de un extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa*, compuesto por un extracto alcohólico que contiene curcuminoides y un extracto acuoso que contiene una fracción proteica para la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir la secreción de las citocinas IL-6 y IL- 8 tras la irradiación con luz ultravioleta.
- 25 6.- Utilización de un extracto acuoso de *Curcuma longa* que contiene una fracción proteica para la fabricación de una composición farmacéutica para tratamiento de la psoriasis.
- 7.- Utilización de un extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa*, compuesto por un extracto alcohólico que contiene curcuminoides y un extracto acuoso que contiene una fracción proteica para la fabricación de una composición farmacéutica como reductor del fibrinógeno.
- 30 8.- Utilización de un extracto de *Curcuma longa*, compuesto por un extracto acuoso que contiene una fracción proteica y un extracto alcohólico que contiene curcuminoides para la fabricación de una composición farmacéutica como reductora del cociente Apolipoproteína B / Apolipoproteína A-I.
- 35

- 5 9.- Utilización de un extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* para la fabricación de una composición farmacéutica según la reivindicación 1 donde la actividad fotosensibilizante es tras la radiación con luz visible.
- 10 10.- Utilización de un extracto acuoso de *Curcuma longa* para la fabricación de una composición farmacéutica según la reivindicación 2 donde la actividad fotosensibilizante es tras la radiación con luz visible.

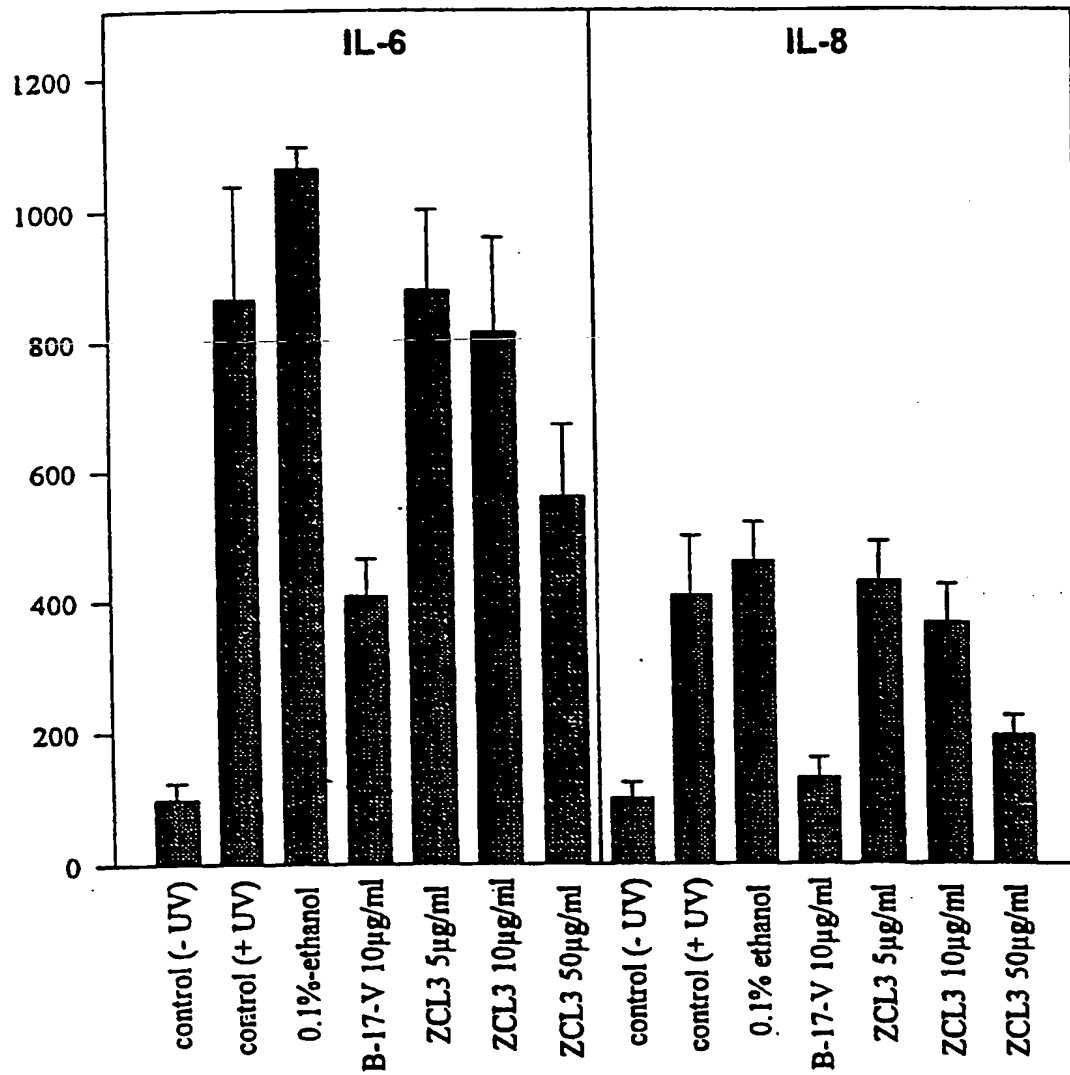


FIG. 1

WO 01/21185

PCT/ES00/00354

2/8

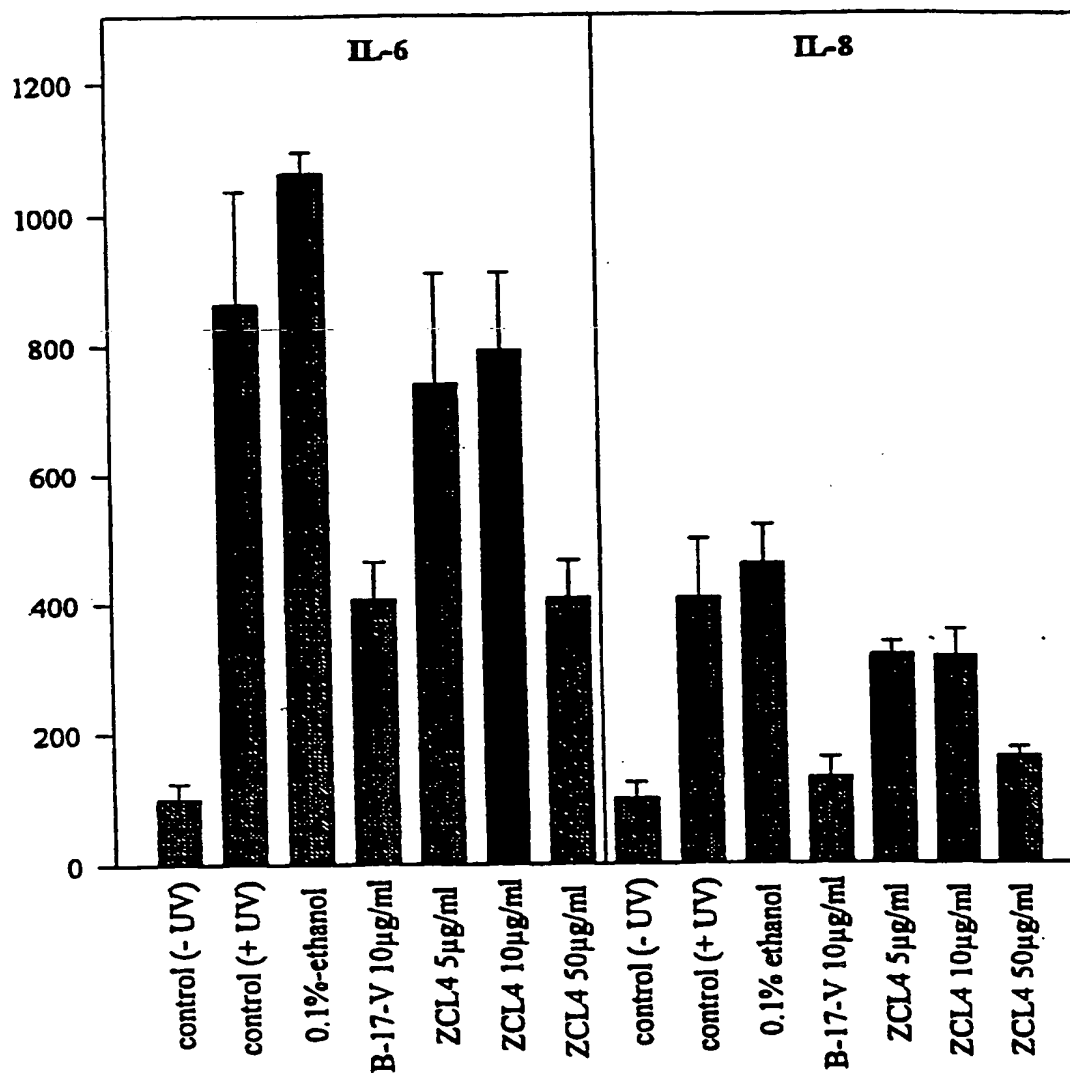


FIG. 2

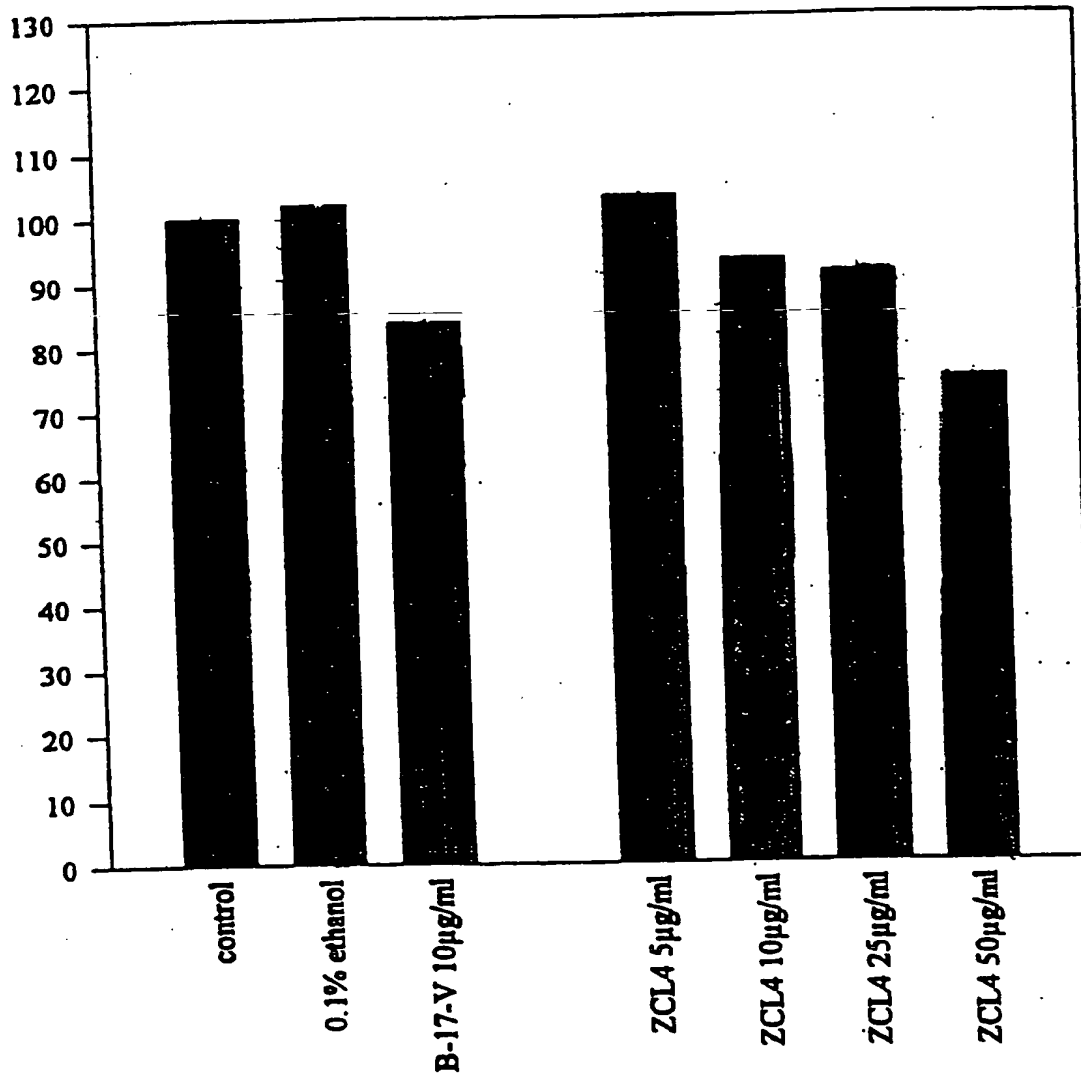


FIG. 3

WO 01/21185

PCT/ES00/00354

4/8

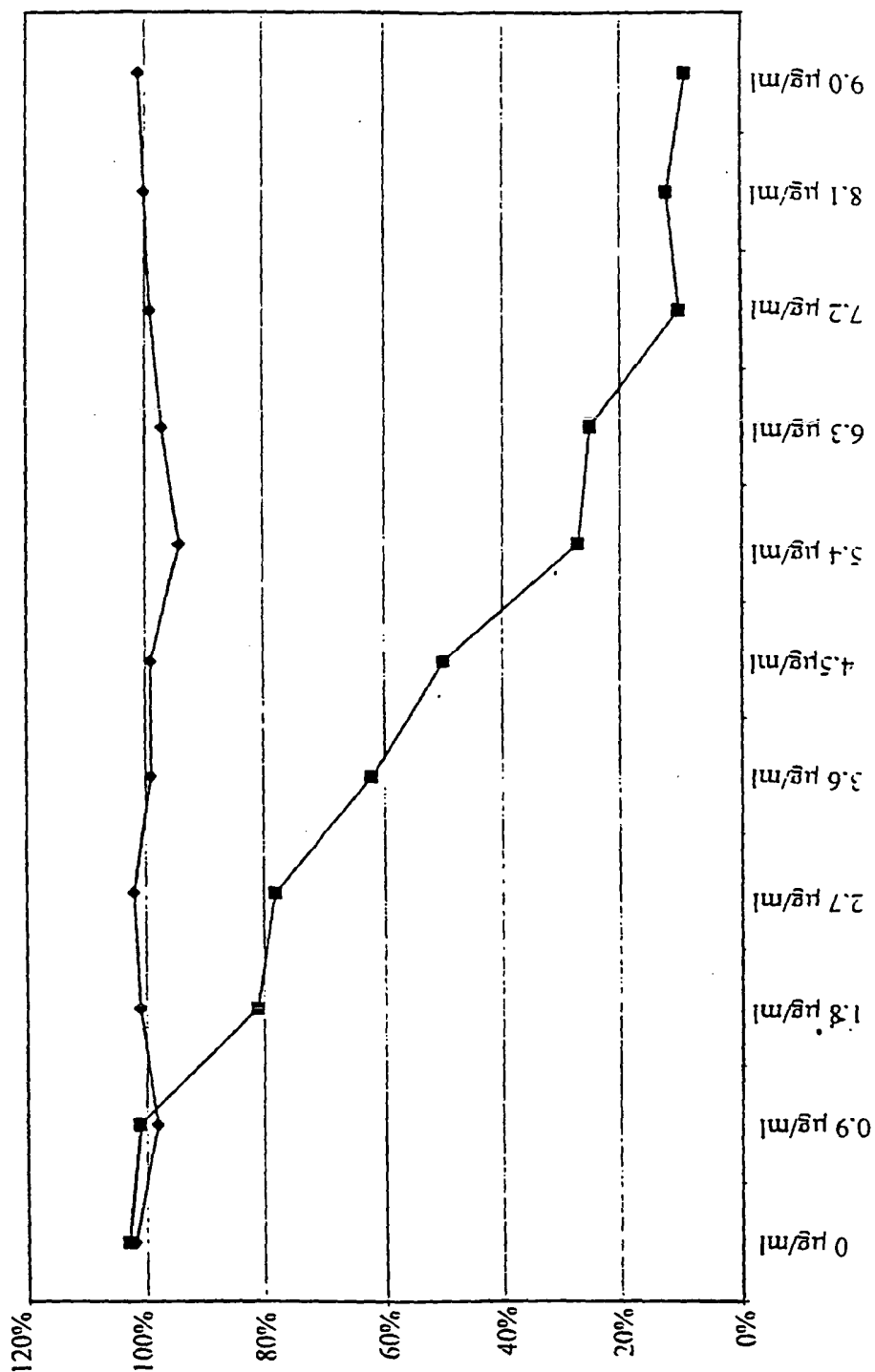


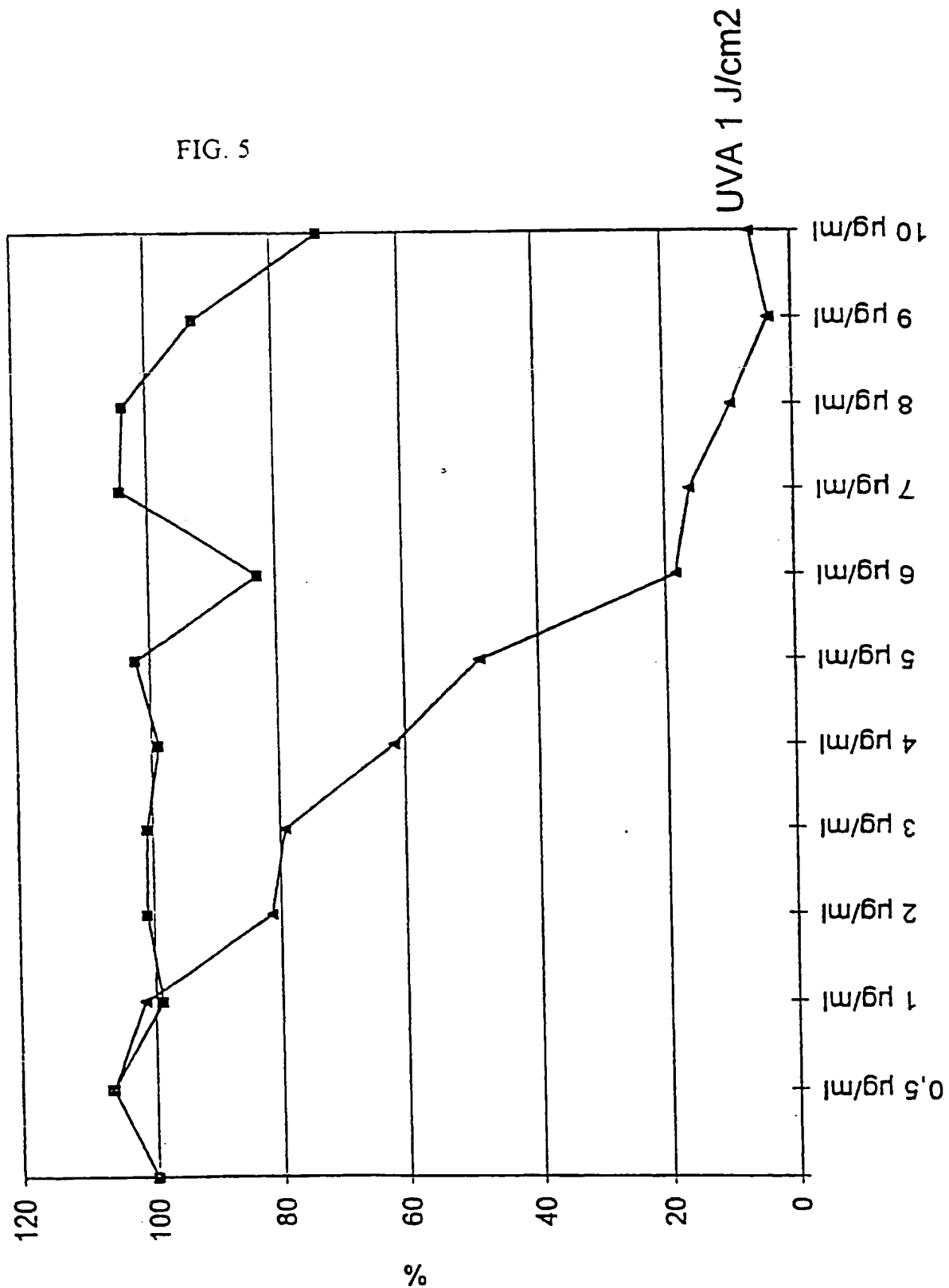
FIG. 4

WO 01/21185

PCT/ES00/00354

5/8

FIG. 5

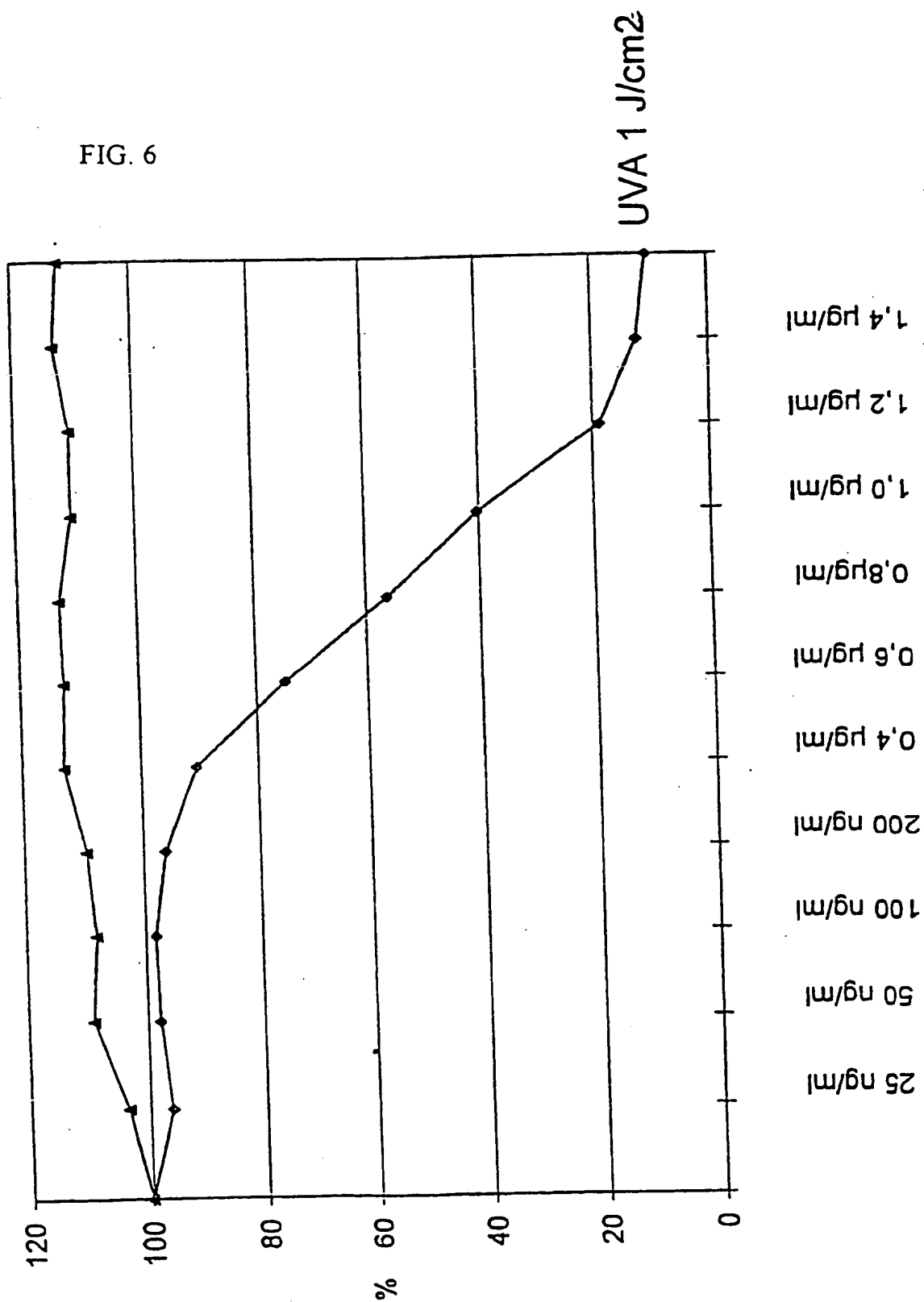


WO 01/21185

PCT/ES00/00354

6/8

FIG. 6

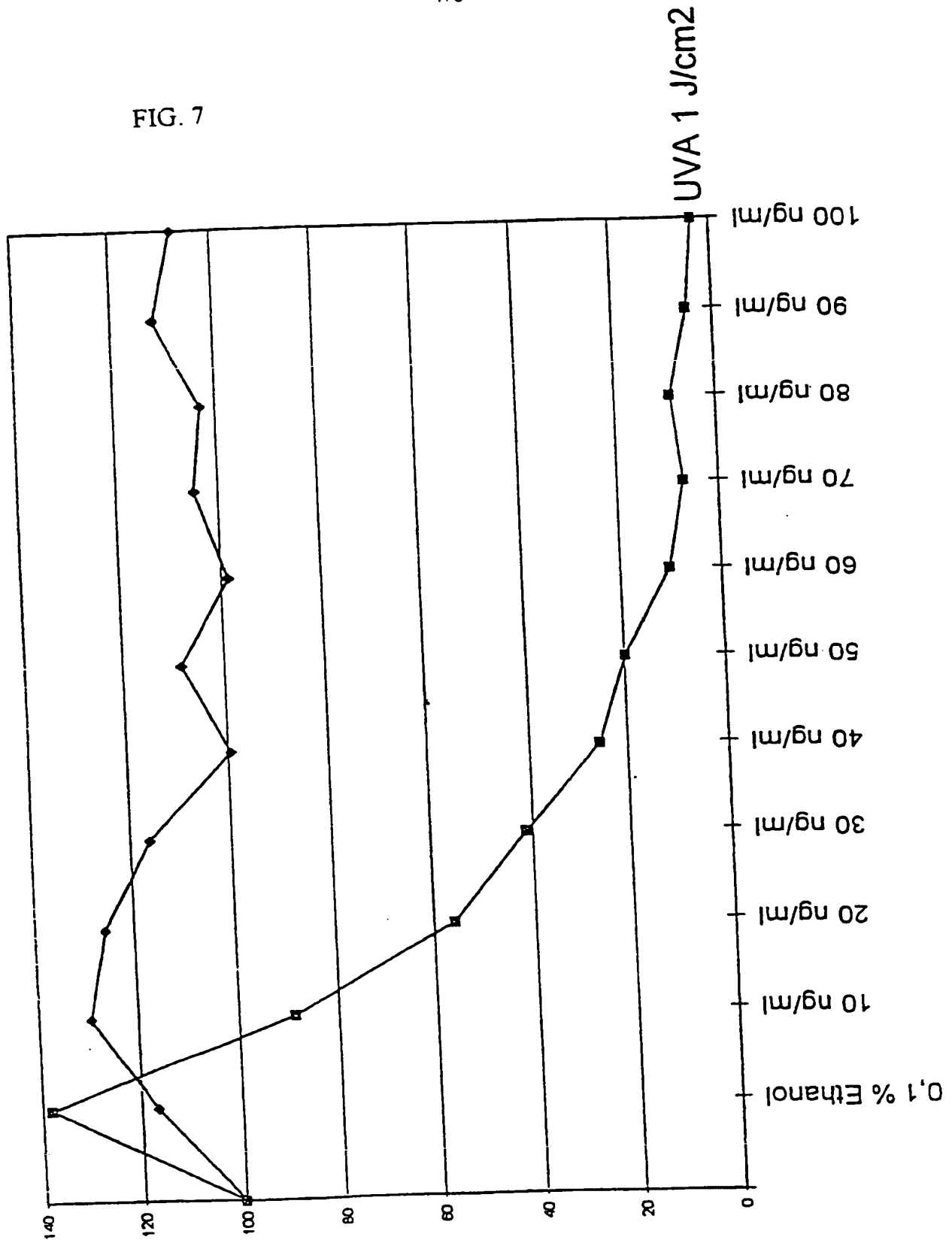


WO 01/21185

PCT/ES00/00354

7/8

FIG. 7



WO 01/21185

PCT/ES00/00354

8/8

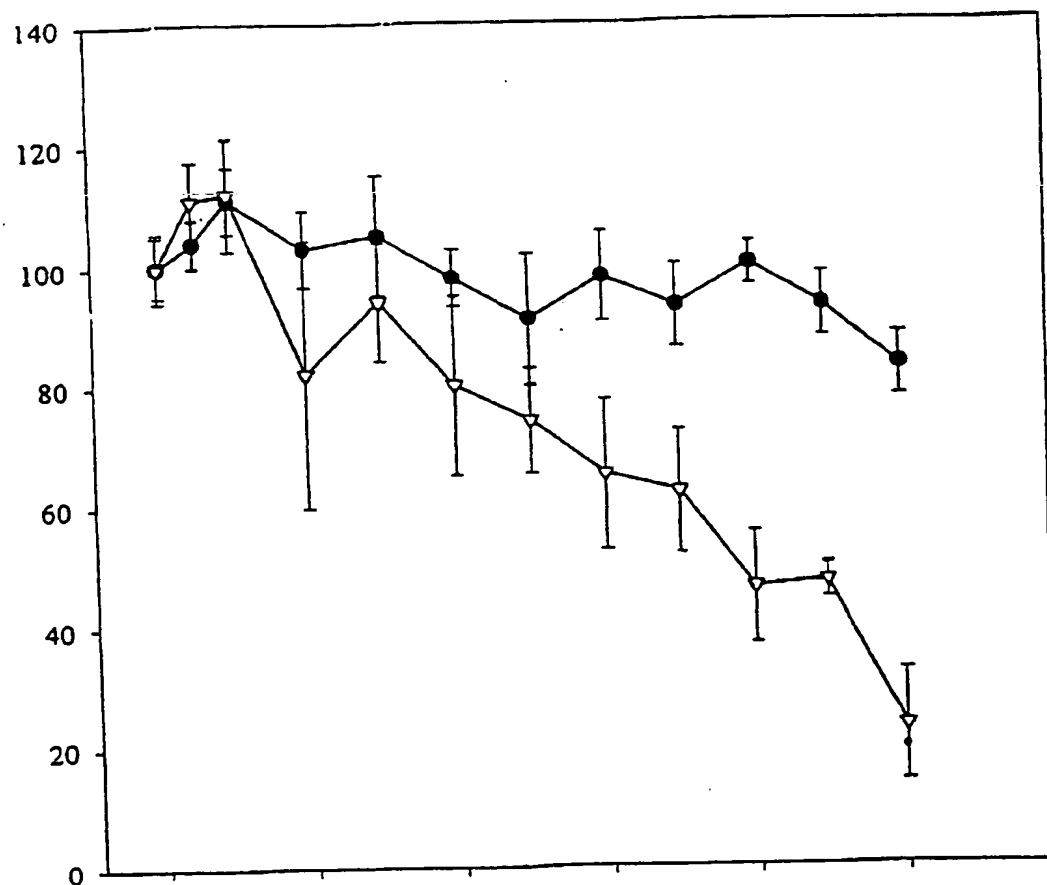


FIG. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 00/00354

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K 35/78, A61P 17/06, A61P 7/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K 35

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, PAJ, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MIQUEL, J. et al. Effects of Turmeric on blood and liver lipoperoxide levels of mice: lack of toxicity. Age, 1995: Vol. 18, N° 4, pages 171-174	1,2,7,8,9,10
A	SRINIVAS, L. et al. Turmerin: A water soluble antioxidant peptide from Turmeric (Curcuma longa). Archives of Biochemistry and Biophysics. February 1992, Vol. 292, N° 2, pages 617-623	1,2,9,10
A	DAHL, T. et al. Photocytotoxicity of curcumin. Photochemistry and Photobiology, 1994. Vol. 59, N° 3, pages 290-294	1,9
A	ISHIZAKI, C. et al. Enhancing effect of ultraviolet A on Ornithine Decarboxylase induction and Dermatitis evoked by 12 -O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate and its inhibition by Curcumin in Mouse Skin. Dermatology, 1996. Vol. 193, N° 4, pages 311-317	1,9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 January 2001 (19.01.01)

Date of mailing of the international search report

02 February 2001 (02.02.01)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES00/000354

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUEI-CHEN HUANG et al. Inhibitory effect of Curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation. European Journal of Pharmacology, 1992, Vol. 221, pages 381-384	3,7,8
A	SIMON, A. et al. Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure-activity relationships. Cancer Letters, 1998. Vol. 129, n° 1, pages 111-116	3
A	US 5401777 A (AMMON et al.) 28.03.1995; column 5, lines 56-62	6
A	YASNI, S. et al. Effects of Curcuma xanthorrhiza Roxb. and curcuminoids on the level of serum and liver lipids, serum Apolipoprotein A-I and lipogenic enzymes in rats. Food Chem. Toxic., 1993. Vol. 31, N° 3, pages 213-218	8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 00/00354

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invencción 1ª - Utilización de los extractos de Curcuma longa como agente antiproliferativo y fotosensibilizante y su uso en la psoriasis (Reivindicaciones 1-6, 9 y 10)

Invencción 2ª - Utilización de los extractos de Curcuma longa como reductora del Fibrinógeno plasmático y del cociente Apolipoproteína B / Apolipoproteína A (Reivindicaciones 7 y 8)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/ ES 00/00354

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5401777 A	28.03.1995	RU 2121832 C	20.11.1998
		DE 4137540 A	19.05.1993
		EP 0550807 A	14.07.1993
		CA 2082562 A	15.05.1993
		HU 62801 A	28.06.1993
		ZA 9208554 A	28.07.1993
		JP 5262659 A	12.10.1993
		CZ 9203374 A	15.12.1993
		SK 9203374 A	10.05.1995

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 00/00354

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K 35/78, A61P 17/06, A61P 7/02

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K 35

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT. EPODOC, WPI, PAJ, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	MIQUEL, J. et al. Effects of Turmeric on blood and liver lipoperoxide levels of mice: lack of toxicity. Age, 1995; Vol. 18, N° 4, páginas 171-174	1,2,7,8,9,10
A	SRINIVAS, L. et al. Turmerin: A water soluble antioxidant peptide from Turmeric (Curcuma longa). Archives of Biochemistry and Biophysics. Febrero 1992, Vol. 292, N° 2, páginas 617-623	1,2,9,10
A	DAHL, T. et al. Photocytotoxicity of curcumin. Photochemistry and Photobiology, 1994. Vol. 59, N° 3, páginas 290-294	1,9
A	ISHIZAKI, C. et al. Enhancing effect of ultraviolet A on Ornithine Decarboxylase induction and Dermatitis evoked by 12 -O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate and its inhibition by Curcumin in Mouse Skin. Dermatology, 1996. Vol. 193, N° 4, páginas 311-317	1,9

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 19 Enero 2001 (19.01.2001)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
02 FEB 2001 02.02.01

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado
ASHA SUKHWANI
n° de teléfono + 34 91 3495473

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES00/000354

C (Continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	HUEI-CHEN HUANG et al. Inhibitory effect of Curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth-muscle cell proliferation. European Journal of Pharmacology, 1992, Vol. 221, páginas 381-384	3,7,8
A	SIMON, A. et al. Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure-activity relationships. Cancer Letters, 1998. Vol. 129, n° 1, páginas 111-116	3
A	US 5401777 A (AMMON et al.) 28.03.1995; Columna 5, líneas 56-62	6
A	YASNI, S. et al. Effects of Curcuma xanthorrhiza Roxb. and curcuminoids on the level of serum and liver lipids, serum Apolipoprotein A-1 and lipogenic enzymes in rats. Food Chem. Toxic., 1993. Vol. 31, N° 3, páginas 213-218	8

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 00/00354

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 1 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones n°:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Invención 1ª.- Utilización de los extractos de Curcuma longa como agente antiproliferativo y fotosensibilizante y su uso en la psoriasis (Reivindicaciones 1-6, 9 y 10)

Invención 2ª.- Utilización de los extractos de Curcuma longa como reductora del Fibrinógeno plasmático y del cociente Apolipoproteína B / Apolipoproteína A (Reivindicaciones 7 y 8)

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°.

Indicación en cuanto a la reserva ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.
☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 00/00354

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 5401777 A	28.03.1995	RU 2121832 C	20.11.1998
		DE 4137540 A	19.05.1993
		EP 0550807 A	14.07.1993
		CA 2082562 A	15.05.1993
		HU 62801 A	28.06.1993
		ZA 9208554 A	28.07.1993
		JP 5262659 A	12.10.1993
		CZ 9203374 A	15.12.1993
		SK 9203374 A	10.05.1995